Nitrogen-containing composition resulting from the hydrolysis of wheat gluten and process for producing the same

Publication number:	EP085291G (A1)	Also published as
Publication date:	1998-07-15	T EP0852910 (B1)
Inventor(s):	SANIEZ MARIE-HELENE [FR]; GOUY PIERRE-ANTOINE [FR]; ERPICUM THOMAS [FR] +	US5962254 (A)
Applicant(s):	ROQUETTE FRERES (FR) +	ES2182237 (T3)
Classification:		DK852910 (T3)
· international:	A23J3/18; A23J3/34; A23K1/16; A23L1/305; (IPC1- 7): A23J3/18, A23J3/34; C12N1/20	more >>
- European:	A23J3/18; A23J3/34C; A23K1/16G; A28L1/905B	
Application number:	EP19980400024 19980108	Cited documents:
Priority number(s):	FR19970000198 19970110	DD233932 (A1)
		DE4116744 (A1)
		W08906091 (A1)
		US2628931 (A)
		☐ EP0026126 (A1)

Abstract of EP 0852910 (A1)

A nitrogenous compositions (I) resulting from the hydrolysis of wheat gluten with corn steep liquor, has a ratio of concentrations of inorganic phosphorus (Pi) to total phosphorus (Pi) (PiPi) of t = 0.15 and a ratio of concentrations of smither nitrogen (Ne) to total nitrogen (Nt) (NeAN) of t = 0.11.

Data supplied from the espacenet database --- Worldwide

FASCICULE DE BREVET EUROPEEN

(45) Date de publication et mention de la délivrance du brevet. 28 98 2002 Builletin 2002/35

(12)

(51) Int CI7: **A23J 3/18**, A23J 3/34, C12N 1/20

- (21) Numéro de dépôt: 98400024.0
- (22) Date de dépôt: 08.01.1998
- (54) Composition azotée résultant de l'hydrolyse du gluten de blé et son procédé de fabrication Stickstoff enthaltende Zusammensetzung erhalten durch die Hydrolyse von Weizengluten und Verfahren zu ihrer Herstellung

Nitrogen-containing composition resulting from the hydrolysis of wheat gluten and process for producing the same

- (84) Etats contractants désignés; AT BE CH DE DK ES FI FR GB IT LI NL SE
- (30) Priorité: 10.01.1997 FR 9700198
- (43) Date de publication de la demande: 15.07.1998 Bulletin 1998/29
- (73) Titulaire: Roquette Frères 62136 Lestrem (FR)
- (72) Inventeurs.
 Saniez, Marie-Hélène
 59350 Saint Andre (FR)

- Gouy, Pierre-Antoine 59840 Perenchies (FR)
- Erpicum, Thomas
 62136 Richebourg (FR)
- (74) Mandataire: Boulingulez, Didier Cabinet Plasseraud 84, rue d'Amsterdam 75440 Paris Cedex 99 (FR)
- (56) Documents cités: EP-A- 0 026 125 DD-A- 233 932 US-A- 2 628 931

WO-A-89/06091 DE-A-4 116 744

Il est rappelé que. Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, aupres de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

Description

- [0001] La présente invention a pour objet une composition azotée résultant de l'hydrolyse du gluten de blé par de l'eau de trempe issue de l'amidonnerie de mais.
- [0002] La présente invention concerne également un procédé de fabrication d'une telle composition azotée, ainsi que son application comme milieu de culture dans les industries de fermentation et comme aliment ou additif alimentaire dans des compositions destinées aux humains ou aux animaux.
 - [0003] Le gluten de bié d'une part, et le com steep d'autre part sont connus pour être une source d'azote dans les industries de fermentation.
- D004] Capendant, le gluten de bié est une source d'acides aminés mal équilibrée. C'est pourquoi son utilisation dans les industries de fermentation et comme aliment ou additrá alimentaire nécessite de le supplémenter en acides aminés par addition de substances contenant les acides aminés indispensables permetant de rééquilibrer as composition. Cet apport d'acides aminés peut se faire sous la forme de corn steep, de protémes de coton, d'extraits de levure, ou d'acides aminés libres.
- 15 [0005] Quoi qu'il en soit, le gluten de blé sous forme non hydrolysée, enrichie ou non en soides aminés, est une source d'azote difficiement utilisable, voire inutilisable, dans les industries de fermentation de par ses propriétés viscoélastiques. Sa solubilisation s'avère donc indispensable si on souhaite le mettre en ceuvre dans des procédés de biotechnologie ou en tent qu'aliment ou additif alimentaire.
- [0008] Cette solubilisation du gluten peut être réalisée soit par hydrolyse acide, soit par hydrolyse alcaline, soit par l'hydrolyse enzymatique. Par exemple, la demande de brevet US 5.273.773 décrif l'obtention de produits partiellement hydrolysés grâce à des traitements spécifiques de protéines. Ces produits sont intéressants pour l'amélioration de la qualité des aliments ou comme agent dispersant.
- [9007] L'utilisation des enzymes endogènes de microorganismes tels que des levures a également dejà été mise à profit pour hydrolyser des protéines telles que celles du soja ou du mais (demande internationale de brevet WO-A-91/16447). L'hydrolyse est alors effectuée par les enzymes responsables de l'autolyse de la levure, enzymes non commercialisées, ou par l'addition d'enzymes exogènes ou le mélange des deux. Le mélange hydrolysé est alors utilisé en alimentation.
- [0008] Le com steep qui, rappelons-te, est obtenu par évaporation de l'eau de trempe issue de l'amidonnerie de maîs, est connu pour être une source d'azote très intéressante dans les industries de fermentation. Il est utilisé dans la plupart des productions biologiques, d'antibiotiques, de vitamines, d'acides organiques, d'enzymes. Il est également utilisé dans la production de biomasse.
 - [0009] La trempe du mais constitue la première étape de l'extraction de l'amidon en amidonnerie humide. Elle consiste à maintenir le mais placé dans les silos pendant un temps donné au sein d'une eau chaude contenant une faible quantité d'anhydride sulfureux, ceci afin de faciliter la séparation ultérieure protéines-cellulose-amidon, et d'empêcher par ailleurs la croissance de microorganismes indésirables.
 - [0010] Au cours de catte opération, deux phénomènes essentiels prennent place simultanément. D'une part, les matéries solubles hautement fermentescibles contenues dans les grains de mais sont transférées dans les eaux de trempe. D'autre part, les conditions de trempe (présence de sulfites, de sucres, profil de température) sont favorables au développement rapide de bactéries, lacitques principalement.
- 40 [0011] Les eaux de trempe sont ensuite concentrées à environ 50 % de matière sèche dans un évaporateur, pour obtenir un sirop épais appeté couramment "corn steep" par l'homme du métier.
 - [0012] Le principal intérêt du com steep lient à sa composition particulière due au transfert et à la transferion par fermentain lactique de ces matières soluties. Cette composition contient des facteurs favoribles à la croissance des microorganismes, et font du com steep une source idéale de matières nutritives, notamment dans les industries de fermentation.
 - [0013] En effet, le corn steep confient en tant que sources de carbone facilement assimilables des sucres et des acides organiques, comme sources d'azote : des amino-acides et des polypeptides et comme sources d'oligo-éléments nécessaires à la croissance des microorganismes : des agents "tampons" et des minéraux.
- [0014] En outre, il constitue un substrat relativement peu coûteux, comparativement aux extraits de levures qui représentent la mailière de référence dans ce domaine, et qui sont utilisés également en alimentation humaine et animale.
 - [0015] Pour une utilisation en fermentation, le com steep doit être soumis au présiable à une stérilisation, dont les conditions de température et de pH ainsi que la durée sont choisies afin d'obtenir la destruction des microorganismes. Ainsi, la température de stérilisation est pénéralement comprise entre 105 et 130°C et le pH varie entre 3,0 et 8,0
- [0018] La demande de brevet JP-A-5.336.954 ensaigne que le mélange de com steep avec une proteine telle que l'albumine d'ocuf soumis à une hydrolyse enzymatique peut être intéressant comme source d'accide pour la croissance des microorganismes suivants: Excherichia coi. Bacillus subilia. Lactobacillus brevis, Serralia marcescens. Ce milieu de culture est aussi chia sconnomique qu'un milieu à basa de ocetone.

[0017] Des mélanges de substances azotées ont été également décrits dans le brevet US-A.2 282931 et control se partie de l'experience de l'également décrits dans le brevet US-A.2 2829 21 et 20 et control se temperature comprise entre de lbé puis stérifiée en autoclaive à une température comprise entre d'étre inoculé avec une souche de Streptomyces griseus. Cette source d'azote est favorable à la production de Streptomyces.

[0018] La demande de brevet internationale WO-A-89/06091 propose un procédé de modification du gluten consistant à traiter du gluten, humide ou seci, avec un effluent provenant d'une opération du procédé d'extraction de l'amidon. Ce procédé tre part de la présence, en très faible quantité, d'acide lactique dans un tel effluent pour modifier le gluten Cet effluent subit présablement un traitement, thermique ou non, pour détruire les microorganismes et inactiver les enzymes qui y sont présents. Le temps de traitement du gluten est compris entre 10 mn et 2 h, durée qui ne permet pas une hydrolyse enzymatique du gluten. De ce fait, le gluten ainsi modifié a des propriétés émulsifiantes et de moussage améliorées, propriétés qui ne sont pas du tout recherchées dans les industries de fermentation et de l'alimentation animale.

[9019] Le procédé de trempe du mais décrit dans le brevet EP-8-026.125 montre que la fermentation lactique caractéristique de ce procédé est totalement maîtrisée et que les bactéries de la trempe présentent, grâce à ce procédé, une activité biologique maximale.

[0020] Par ailleurs, E. Tsakalidou et al. (J. Dairy Sci., 76: 2145-2151, 1993) et G. Pritchard et al. (FEMS Microbiology Reviews 12 (1993) 179-206) ont montré que les bactèries lacitiques possèdent des systèmes proteolytiques complexes localisés dans la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique ou à l'intérieur de la cellule, que les enzymes faisant partie de ces systèmes proteolytiques travaillent à 46°C à des pH compris entre 4 et 6.

[0021] Cette activité protéolytique puissante des bactéries lactiques contenues dans l'eau de trempe, éventueilement renforcée par une protéese commerciale, va permettre la protéolyse du gluten de blé. Cette protéolyse est facilitée par l'action solubilisante de l'accide lactique (contenu dans l'éau de trempe) sur le gluten de blé.

[0022] L'invention se rapporte donc en premier lieu à une composition azotée résultant de l'hydrolyse du gluten de blé, caractérisée en ce qu'elle présente un rapport des concentrations en phosphore inorganique sur phosphore total (Pi/Pt) supérieur ou égal à 0,15 et un rapport des concentrations en azote aminé sur azote total (Na/Nt) supérieur ou égal à 0,11.

[0023] Les concentrations en phosphore inorganique et phosphore total sont mesurées selon des méthodes connues et telles que celles décrites ci-après.

[0024] En ce qui concerne le phosphore inorganique, la méthode de référence consiste à axtraire le phosphore minieral ou inorganique par une solution d'acide triolhoracetique, à former un complexe phosphomolybidique par réaction entre le phosphore inorganique et du molybdate d'ammonium et à mesurer l'absorbance de ce complexe au spectrophotomètre à une lonqueur d'onde de 805 m.

19025] En ce qui concerne le phosphore total, son dosage est réalisé seton la métrode norme ISO 3946, qui repose sur le même principe que celui appliqué à la détermination de la concentration en phosphore inorganique, décrit cidessus. Une étape préalable est toulefois mise en œuvre, étape qui consiste à détruire les matières organiques des produits à doser de manière à transformer tout le phosphore organique en phosphore inorganique (le phosphore total est donc le phosphore organique plus le phosphore inorganique), per minéralisation à faite d'un mélange sulfonitique et transformation des phosphates en orthophosphates. Les étapes suivantes consistent à former le complexe molybdique, puis à mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 255 mm.

40 [0026] De préférence, le rapport concentration phosphore inorganique sur concentration en phosphore total (Pi/Pt) est compris entre 0,20 et 0,35, et de manière encore plus préférentielle, entre 0,25 et 0,35.

[0027] Les concentrations en azote aminé et azote total sont mesurées selon des méthodes connues et telles que celles décrites ci-après.

[9028] En ce qui concerne l'azote aminé, son dosage est effectué en faisant réagir la fonction amine du produit à doser avec un excès de formaldéhyde, pour donner un acide qui peut être tiré avec une solution de soude. L'azote aminé libre est équivalent (mole à mole) à l'hydroxyde de sodium utilisé pour le titrage.

[0029] En ce qui concerne l'azote tolt, son dosage est réalisé selon la méthode norme ISO 3188 qui consiste en une minéralisation du produit à los testes par l'acide sette en care desence d'un catalysseur, puis en une aiscalinisation des produits de la reaction et en une distilliation de l'ammoniac libéré recueilli dans une solution d'acide borique qui est titré par une solution d'acide butinique.

[0030] Les taux de protéines totales et de protéines solubles de la composition conforme à la présente invention sont respectivement compris entre 50 et 85 % sur sec et 40 et 65 % sur sec.

(0031) On entend par taux de protéines totales, l'azote total multiplié par un facteur 6.25.

[0032] On entend par taux de protéines solubles, l'azote total multiplié par un facteur 6,25 contenu dans la fraction soluble qui correspond au surrageant obtenu après dispersion de l'échantillon dans l'eau distillée et centrifugation.

[0033] En outre, la composition azotée conforme à l'invention se caractérise notamment par une teneur en leucine libre supérieure ou égale à 1300mg/100g sec et une teneur en alanne libre supérieure ou égale à 1100mg/100g sec (10034) Enfin, la composition azotée obiet de la présente invention comprend de nombreur macro- et microéléments

minéraux. Elle se caractérise par une teneur en cendres comprise entre 3 et 12 % sur sec et, de préférence, comprise entre 4 et 6 % sur sec. Une telle teneur en macro- et microéléments minéraux naturels, combinée avec les autres caractéristiques de la composition selon l'invention et qui sont décrites ci-dessus, lui confère des propriétés avantaqueuses pour son utilisation en alimentation animale (richesse en azole élevée, teneur en cendres < 6 %).

[0335] L'invention se rapporte en second lieu à un procédé de fabrication d'une composition azoté résultant de l'hydrolyse du gluten de blé par de l'eau de trempe de mais et qui possède les caractéristiques mentionnées ci-dessus, [0336]. Ce procédé consiste essentiellement à mélanger du gluten de blé avec de l'eau de trempe issue de l'amidonnerie de mais.

[0037] Le gluten de blé utilisé est de préférence un gluten vert issu du procéde d'extraction du gluten par lixiviation de la farine de blé. En effet, avant séchage, le gluten dit "vert" contient également une flore factique naturelle qui est une source d'enzyme protéolytique intéressante. Il est également une source de phytase naturelle végétale qui peut être mise à crofit pour hydrobser les phytates contenus dans l'eau de tremes.

[0038] Le procédé de l'invention tire parti à la fois de la flore lactique du gluten vert, de l'effet protéolytique des anzymes des bactéries lactiques présentes dans l'eau de trempe, et de l'action solubilisante de l'actide lactique présent écalement dans l'eau de trempe.

[0039] Le procédé de fabrication de la composition azotée conforme à l'invertion permet ainsi l'obtention d'une gamme de compositions que l'on peut définir comme des ochydrolysats d'eau de trempe et de gluten de bie. L'hydrolyse du gluten de bie éta effectuée grâce aux enzymes protéolytiques et peptidisatiques des ferments lactiques. Cet de hydrolyse peut encore être améliorée par l'addition d'une protéase exogêne commerciale qui va agir en synergie avec les enzymes naturelles des ferments lactiques. Les phytates de l'eau de trempe sont lydrolysés grâce à la phytase naturelle du ble, cette dernière en étant pas dématurée par le procédé d'extraction de gluten utilise.

[0040] Ainsi, de manière surprenante et inattendue, la Demanderesse a mis en évidence que si l'on effectus l'hydrolyse du glutien de bié contenant une phytase naturelle en présence d'eau de trempe isseue de l'amidonnerie de malis et contenant des ferments lactiques actifs, une hydrolyse spécifique du glutien de bié ainsi qu'une hydrolyse spécifique du glutien de bié ainsi qu'une hydrolyse spécifique de l'eau de trempe s'effectuent. Cette double hydrolyse confere à la composition azotée finale des propriétés bien particulières telles que l'induction de la croissance de différents microgranismes, l'induction de la production de certains métabolités et ceci, de manière bien plus avantaceuse que le mélance qu'une sectorn stere.

[0041] Le procédé selon l'invention comprend les étapes successives consistant à mélanger de l'eau de trempe issue de l'amidonnerie de mais avec du gluten de bié, à laisser agir, sous agitation, les enzymes et l'acide lactique naturellement présents dans le gluten et l'eau de tremps pendant une durée qui dépend des quantités mises en œuvre, à inactiver les enzymes, puis à concentirer la composition résultante par évaporation.

10042] Les matières mises en œuvre dans le procédé de l'invention sont donc l'eau de trempe issue de l'amidonnerie de mais et le gluten de bié. L'eau de trempe provient, de préférence, du dermier silo de trempe du procédé décrit dans le brevet FR-B-026 125. Elle présente une matière sèche comprise entre 7 et 13 Brix environ, et de préférence égale à 10 Brix. On rappelle que le Brix est une unité de mesure couramment employée dans l'industrie amidonnière, et que le Brix d'une eau de trempe est déterminé très sisément par lecture au réfractomètre. Un Brix d'environ 10 correspond pour le produit visé par l'invention à une matière seche d'environ 10 %

[0043] L'eau de trempe utilisée dans le procédé conforme à l'invention n'a subi aucun traitement thermique (évaporation), mécanique ou chimique susceptible de déturie les enzymes protéchyliques qui y sont naturellement présentes. Il ne s'acit dono pas de com stepo, lequel est obtenu par évaporation de l'eau de trempe.

[0044] Comme déjà mentionné, le gluten de blé mis en œuvre dans le procédé est de préférence du gluten de blé vert, quoique l'on puisse également mettre en œuvre du gluten de blé sec.

[0045] En fonction des applications recherchées pour la composition azotée de l'invention, il est possible d'effectuer des mélanges dans des proportions eau de trempergluten de tilé comprises entre 1/1 et 1/3, ces rapports étant exprimés sur une base sèche.

[0046] Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, on ajoute au mélange constitué par l'eau de trempe et le gluten une enzyme exogène choisie dans le groupe constitué par les protéases et les phytases seules ou en mélance entre elles

[0047] Les quantités de l'enzyme exogène utilisée dépendent de l'activité propre à l'enzyme choise et des commisses amise en ceuvre (concentration du substant, ph.; température, durée du traitement). Ces quantités sont comprisse entre 0,25 % et 1 % par rapport à la matière séche du substrat, ce qui correspond environ à une plage de 0,05 UA (Unité ANSON) à 2 UA pour 1000 de matière séche du substrat,

[0048] Les protéases utilisables dans le procédé selon l'invention sont choisies en particulier dans le groupe constitué par les protéases acides, telles que celles fabriquées par la Société BICOCON (ACID PROTEASE LB 59), par la Société GIST BROCADES (PROTEASE A), par la Société ROHM (COROLASE PS), par la Société GENENCOR (PROTEASE B99), ou encore par la Société NOVO (FLAVOURZYME, NEUTRASE).

[0049] Les protéases commerciales se présentent sous forme de préparations enzymatiques brutes extraites de microorganismes et possèdent de ce fait des activités enzymatiques secondaires telles que phosphatase, cellulase

et lipase. Ces enzymes secondaires, et en particulier les phosphatases, participent avantageusement au traitement de l'eau de trampe du mais.

[0050] La phytase exogène utilisable dans le procèdé selon l'invention est par exemple celle fabriquée par la Société BASE (NATUPHOS).

[0051] Le mélange de gluten, d'eau de trempe et éventuellement de protéase exogène est maintenu entre 4 et 8 heures à une température d'environ 48°C. Le pf naturel du mélange, compris entre 5 et 5.5, est conservé. Le traitement est de préférence effectué sous ariation constante.

[0052] Lorsque les rapports PIPT et NaRh attaignent les valeurs désirées, les réactions enzymatiques peuvent être stoppées par mactivation des exymes. Pour cels, on a recours à des moyers physiques (température) et/ou chimièu (pH). De préférence, on soumet le milieu réactionnel à un chauffage à 60-90°C pendant un temps compris entre 10 et 20 minutes.

[0053] La composition azotée peut alors être concentrée à 50 % de matière sèche par évaporation, soit pour être conservée sous forme liquide, soit pour être atomisée ou déshydratée d'une autre manière appropriée.

[0054] La composition selon l'invention, grâco à ses caractéristiques particulières, présente un intérêt certain lorsqu'elle est utilisée comme substrat de la croissance microbienne dans les industries de fermentation. Ainsi, lorsque la composition conforme à l'invention est fabriquée à partir d'un mélange eau de trempe/gluten dans un rapport 1/1 (exprimé sur une base séche), elle constitue un substrat satisfaisant à la production dans de bonnes conditions de lavures, de bactéries lactiques, ou d'autres microorganismes.

[0055] Elle est également particulièrement adaptée à la production de métabolites obtenus par des microorganismes génétiquement modifiés.

[0056] En outre, elle intéresse l'industrie alimentaire, pour ses propriétes nutrisonales et pour ses propriétés rematiques, et est unis utilisable en anta qu'alimenta ou en tant qu'aliment ou en tant que aliment en anta qu'aliment ou en tant qu'aliment ou en tant qu'aliment et en terre à l'aliment et de l'arche de

25 [0057] D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront clairement à la lecture des exemples donnés ci-après qui viennent illustrer l'invention sans toutefois la limiter.

EXEMPLE 1

40

45

[0058] Dans un réacteur de 21, 1 i d'eau de trempe à 10 % de matière sèche, issue du demier silo de trempe du procédé décrit dans le brevet FR-B-026 125, est mélangee avec 1 kg de gluten vert 0,5 g d'enzyme du type protéasse acide BIOCON LB59 est également ajouté au mélange. Le pH naturel de 4,5 du mélange est conservé, il n' y a pas de régulation de pH. Le mélange est maintenu pendant 4 heures à 48°-C. On constate alors que l'acide lacique présent dans l'éau de tempe permet une solubilisation immédiate du gluten, ce qui facilité son hydrolyse.

5059] Après 4 heures de réaction, on chauffe le mélange à une température de 70°C afin de neutraliser les enzymes et de détruire les bactèries lactiques. Le mélange est alors concentré à 50 % de matière sèche et/ou peut être également atomisé.

[0060] Selon le rapport eau de trempe/gluten de blé que l'on veut finalement obtenir, les quantités de matières premières utilisées peuvent varier de la façon suivante :

Composition	Rapport	Eau de trempe (en litre) à 10% MS	Gluten vert (en kg) à 30% MS
Α	1/1	1	0,3
В	1/1,8	1	0,6
С	1/3	1	1.0

[0061] A titre de comparaison et afin de démontrer l'intérêt du procédé conforme à l'invention, on a mélangé un gluten prealablement hydrolysé à l'aide de la même protéase exogène avec une quantité de corr steep, de manière à obtenir un ratio 1/3 com steep/gluten en matière sèche (MS) (composition D). On entend par gluten préalablement hydrolysé un gluten préanant un minimum de solubilité de 50 %.

Composition	Rapport	Eau de trempe (en litre) à 50% MS	Gluten sec (en kg)
D	1/3	0,2	0,3

[0062] Le mélange C selon l'invention présente la composition indiquée ci-après. La composition du mélange D est

également indiquée afin de démontrer l'intérêt de l'utilisation de l'activité protéolytique de l'eau de trempe.

8 % 65 - 72 %
% 0,1%
ppm < 100 ppm
1% 1,3 à 2%
0,10 0,11 à 0,20
5% 5à6%
25 > 0,25
12% 10à12%

- [0063] La composition C selon l'invention se caractérise donc par :
 - une teneur en azote supérieure à 10 %,

10

30

35

45

- une teneur en cendres inférieure à 6 %,
- un ratio azote aminė/azote total > 0,11,
- une teneur en fer inférieure à 100 ppm,
- une teneur en sucres réducteurs inférieure à 0,1 %,
- une teneur en phosphore total supérieure à 1 %,
- une teneur en slanine > 1100 mg/100g sec.
- une teneur en leucine > 1300 mg/100g sec.
- [0064] Les analyses en aminoacides libres des compositions C et D sont données dans le tableau suivant :

mg/100g sec	Mélange D	Mélange C
A. aspartique	20	< 10
Thréonine	145	240
Sérine	165	375
A. glutamique	60	165
Proline	470	645
Glycine	100	180
Alanine	785	1160
Valine	270	425
Cystine	< 10	< 10
Méthionine	170	300
Isoleucine	170	290
Leucine	650	1335
Tyrosine	25	85
Phénylalanine	275	545
Histidine	50	15
Omithine	< 10	75
Lysine	35	75
Arginine	50	60

[0065] Quant aux propriétés physiques, le mélange C présente une solubilité supérieure à 70 %.
[0066] Par solubilité, on entend la matière séche du surrageant obtenu près centrifugation d'un échantillon dilué
dans l'éau exprimée en pourcentage de la matière séche totale mise en oeuvre.

EXEMPLE 2

[0067] Pour pouvoir démontrer l'action spécifique de l'eau de trempe sur le gluten de blé, quatre essais ont été réalisés conformément au procédé de l'invention :

```
Essai 1 : Gluten (100g sec/l) + eau de trempe (1 litre à 10 Brix),
```

[9068] On travaille à pourcentage de matières sèches égal. Le corn steep 20 Brix est difué pour obtenir une matière sèche de 10 %.

[0069] Le fait de remplacer l'eau de trempe par du com steep liquide 20 Brix permet de vérifier l'efficacité des enzymes protécityques de l'eau de trempe sur les protécites du gluten. Dans le com steep, ces enzymes sont en effet détruites au niveau du traitement thermique de l'évaporation.

[0070] Les résultats (exprimés en %/sec) sont rassemblés dans le tableau qui suit.

Essai	1	2	3	4
Matière sèche	53	53	53	48
N. 6,25 total	64	64	65	65
N. 6,25 soluble	31	50	25	50
N. 6,25/N. 6,25	0,5	0,8	0,4	0,8
soluble / total				
N. aminé	1,74	2,13	1,55	1,90
Na/Nt	0,17	0,21	0,15	0,18
Cendres	11	12,5	11	11
Total A. aminés libres	8,1	11,5	7,2	10,3
Nt	10,24	10,24	10,4	10,4
Pi/Pt	0,2	0,22	0,2	0,22

[0071] La solubilité (en % sur sec) des compositions des essais 1 à 4 en fonction du pH a également été mesurée. Les résultats obtenus sont rassemblés ci-après.

Essai	1	2	3	4
pH 3,0	50	85	40	85
pH 4,0	50	82	40	75
pH 5,0	58	82	47	80
pH 6,0	54	79	44	80
pH 7.0	54	77	44	80
pH 8,0	54	74	45	81

[0072] Les résultats analytiques de ces quatre essais mettent en évidence l'acton importante des enzymes protéolytiques présentes dans l'eau de trempe. Si l'on compare l'essai 1 à l'essai 3, on s'aperçoit que le rapport N. 6,25 soluble/N. 6,25 total, ainsi que la solubilité aqueues, augmentent de 10 % dans le cas où de l'eau de trempe est utilisée. Il y a donc une action des enzymes protéolytiques contenues dans l'eau de trempe.

[0073] Cette différence disparaît lorsque l'on ajoute 0,5 %/sec d'enzyme (protéase) au mélange. C'est la comparaison des essais 2 et 4 qui le montre.

[0074] Dans ce cas, l'absence d'enzymes protéolytiques dans le com steep est un facteur limitant pour la solubilisation du gluten. Une diminution de la quantité d'enzyme ajoutée provoquerait une baisse de la solubilité du gluten. Par contre, en utilisant l'eau de trempe, il est possible de diminuer la quantité d'enzyme ou d'augmenter la concentration en gluten dans le mélange tout en gardant une solubilité maximale du gluten.

EXEMPLE 3

15

20

25

30

35

50

[0075] Les productions de céphalosparine ont été évaluées en fonction des compositions azotées C et D de l'exemple

[0076] La production de céphalosporine a été effectuée dans les conditions suivantes. Le microorganisme utilisé a été le Céphalosporium acremonum TCC 11550 réglenée sur gelbose CGA dont la composition est la suivante (extrait autolytique de lovure 5 gfl. Glocose 30 gfl. Chloramphéhicol 0,1 gfl. Agar agar 15 gfl).

[9077] Les eriens de production sont inoculés à l'aide du Cephalosporium provenant d'un milieu de préculture de

Essa: 2 : Gluten (100g sec/l) + eau de trempe (1 litre à 10 Brix) + protéase 0.5 %/P. prod. sec.

Essai 3 : Gluten (100g sec/l) + corn steep (0.5 litre à 20 Brix),

Essai 4 : Gluten (100g sec/l) + corn steep (0.5 litre à 20 Brix) + protéase 0.5 %/P, prod. sec.

120 h. Ce milieu de préculture est constitué de 100 ml de bouillon CGA qui est mitroduit dans un erlen de 500 ml à 2 chicanes, erlen qui a été ensemencé à l'aide d'un carré de gélose CGA sur lequel le Cephalosporium a poussé pendant 7 iours.

[0078] Les erlens de production contenant 75 ml de milieu de production, sont ensemencés avec 2 ml de préculture et sont agités à 120 tr/mn pendant 120 h à 30°C. Les milieux de production contiennent:

50 g/l de glucose 2,5 g/l de KH₂PO₄ 5 g/l de CaCO₂

30

25

6 g/l d'huile de soja 3,3 g/l d'équivalent azote du produit testé

[0079] Les produits testés sont la composition C, la composition D et une solution de protèine de coton commercialisée par TRADERS PROTEIN sous l'appellation PHARMAMEDIAF, correspondant à un équivalent azote de 2,6 g/l,

[0080] Après 120 h et ceu afin d'évaluer la production de céphalosporine, 5 ml de chaque etlen de production sont prélevés et centrifugés pendant 15 mn. 65 µl de sunageant d'une dilution d'artiblotique sont placés sur des disques de cellulose eux mêmes placés à la surface d'une boîte de Petri sur laquelle la souche test sensible à la céphalosporine a été étaité, à savoir Stephylococcus sureus ATCC 6538.

[0081] Après 24 h à 30°C, le diamètre d'inhibition de croissance du Staphylococcus est mesuré. A partir des résultats de la garnime de céphalosponine C, on peut tracer le graphique zone d'inhibition en fonction de la concentration en céphalosporine C. Ainai, les différents échantillons testés ont donné les résultats suivants :

Composition D	7,85 mg/10 ml
Composition C	11,6 mg/10 ml
Pharmamédia ^R	5,6 mg/10 ml

100821 La composition C selon l'invention est la meilleure parmi celles testées.

EXEMPLE 4

[0083] L'influence des compositions C et D obtenues dans l'exemple 1 a été testée sur la production de pénicilline selon le protocole décrit ci-après. Une suspension de spores d'une souche P₂ (provenant du laboratoire PANLABS) est utilisée comme inoculum:

[0084] Les flacons de préculture de 500 ml de volume utile et contenant le millieu suivant ajusté à pH $5 \cdot 3$ % de glucose. 1 % de lactose, 0,25 % d'equivalent azote du produit à tester, 0,2 % de (NH₄)₂ SO_a, 0,5 % de CaC₂O, 0,05 % de KhyPO_a. 1 % de Pharmamédia^R, 1 % d'extrait de levures, sont cultivés sur table à secousses à 220 t/mn pendant 45 h à 25°C.

[0885] 2 ml de ce milieu sent introduits dans le milieu de production, répartis à raison de 35 ml dans des flacons de 500 ml à deux chicanes, La composition du milieu est la suivante : 12 % de Latose, 1 % de (NH₂),500, 1 % CaCO₃, 0.65 % de KH₂PO₀, 0.5 % de K₅CO₄, 0.23 % d'équivalent azote du produit à tester, 1 % d'huille de soja, pH 6.6 à 25 °C pendant 6 iours et sous une sa critation de 20 fr/m

[0086] Après 6 jours, on centrifuge pendant le temps nécessaire à l'obtention d'un surnageant limpide qui contient la pénicilline produite.

[0087] Des disques buvard sont imbibés de 65 µl des sumageants et déposés dans des boîtes de Petri contenant un milieu gélose trypticase soja préalablement ensemencé avec la souche de Sarcine lutee ATCC 9341 sensible à la périoditine.

[0088] On mesure alors le diamètre des zones d'inhibition de croissance observées dans les deux cas après incubation pendant 24 h à 30°C. A partir des résultats de la gamme étalon donnant la concentration en pénicilline en fonction du diamètre d'inhibition, les résultats obtenus ont été les suivants:

Composition D	7,80
Composition C	10.95
Pharmamédia ^R	6,80

La composition C selon l'invention est la meilleure parmi celles testées.

EXEMPLE 5

[0089] L'influence des compositions C et D obtenues dans l'exemple 1 a été testée sur la production de tétracycline [0090] La souche utilisée est le Streptomyces aureafaciens DSM 40127.

[0091] A partir de boîtes de Petri contenant le milieu suivant : 20 g/l amidon, 5 g/l de bio-soyase, 5 g/l d'extraits de levure, 10 g/l de glucose, 17 g/l agar, 1 g/l carbonate de calcium, sur lequel la souche de production a sporulé, on récubér les scelluies en cartant la surface du milieu sur 1 orê.

[0092] Il est alors possible d'inoculer le milieu de production suivant : 35 g/l de maltodextrine, 4 g/l d'huille de soja, 5 g/l de CaCO₃, 1 g/l de MgSO₄ et 1 g/l de KH₂PO₄ et 0.83 g/l d'équivalent azote de la composition à tester.

[0093] Après 120 h de culture à 30°C, sous agitation à 220 tr/mn, d'erlens de 500 mi contenant 500 mi de milieu, on centifuge de laçon à obtenir un surmageant l'impide. Ce surmageant est placé sur une pastille de cellulose, elle même placée à la surface d'une boîte de Petri contenant le milieu sur lequel a été étalé un inoculum de Sarcina lutea, souche sensible à la tétracycline.

[0094] On mesure alors le diamètre des zones d'inhibition de croissance observée après incubation pendant 24 h
à 30°C. A part des résultats de la gamme étation donnant la concentration en étracycine en fonction du diamètre
d'inhibition, les résultats du tableau suivant montrent l'intérêt de la composition C selon l'invention dans cette application.

Composition D	3,1 mg/10 ml
Composition C	3,5 mg/10 ml
Pharmamédia ^R	2,2 mg/10 ml

EXEMPLE 6

20

35

40

[0095] Les trois études décrites ci-après consistent à suivre l'augmentation du nombre de cellules en fonction du temps dans un millieu de culture contenant les compositions azotées C, D de l'exemple 1 et des extraits de levure.

[0096] La première étude concerne la levure Saccharomyces cerevisiae.

[0097] On prépare des milieux de culture par addition dans de l'eau déminéralisée de glucose à raison de 10 g/l et 0,1 g/l d'équivalent azote des différentes compositions nutritives.

[0098] On ensemence alors 100 ml de chacun de ces milieux avec 0,1 % en volume d'une préculture de la souche. L'incubation est réalisée à 30°C sous une agitation de 280 trimn pendant 24 h. Les numérations sont effectuées aux temps 0, 8, 24 h sur milieu OGA (Oxytétracycline - Glucose - Agar). Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-après.

CFU/ml	0 h	8 h	24 h
Composition D	4,2.103	1,9.106	4,1.108
Composition C	1,7.103	5,8.10 ⁶	8,9.108
Extrait de levure	3,1.103	1,1.108	3,9.108

[0099] La population obtenue est 2 fois plus importante avec la composition C selon le procédé, que celle obtenue avec l'extrait de levure ou la composition D.

[0100] La seconde étude a été réaisée avec la souche Bacillus sublitis dans des conditions identiques à celles qui viennent d'être décrites. Les milieux de culture sont préparés par addition de glucose (10 g/l), de sels (MgSQ₄, KH₂PQ₄, tous deux à 0,05 g/l) et des compositions nutritives C et D ainsi que des extraits de levure en équivalent azole 0,1 g/l I Les conditions d'ensemencement et d'incubation sont identiques à celles décrites précèdemment. Les numérations sont effectuées aux temps 0, 8 et 24 haur milleu gélose trypticase soja. Les résultats donnés ci-après confirment les conclusions précédentes à sevoir l'intérêt des compositions azolées selon l'invention comme substrat de fermentation.

CFU/ml	0 h	8 h	24 h
Composition D	3,3.102	2,3.10 ⁵	1,8.107
Composition C	3.3 102	5,9.105	4,9.107
Extrait de levure	2,9.102	3,1.105	3,2.107

[0101] La troisième étude a été réalisée avec la souche Lactobacillus plantarum.

[0102] On prépare des milieux de culture par addition dans de l'eau déminéralisée de glucose à raison de 10 g/l et

de la composition azotée C et D de l'exemple 1 ainsi que des extraits de levure d'équivalent azote 0,1 g/l. L'incubation est réalisée à 45 C sous légère agitation pendant 24 h. Les numérations sont effectuées aux temps 0, 8 et 24 h sur millieu MRS (MAN, RGGGSA, SHARP).

CFU/ml	0 h	8 h	24 h
Composition D	3,3.102	2,3.105	1,8.107
Composition C	3,3.102	5,9.105	4.9.107
Extrait de levure	2,9.102	3,1.105	3,2.107

[0103] Les résultats obtenus montrent l'intérêt de la composition C conforme à l'invention.

EXEMPLE 7

10

20

15 [0104] Le mélange de l'exemple 1 peut également être utilisé en alimentation animale. En effet, étant donné sa composition, on peut l'utiliser comme ladouemplaceur dans l'alimentation des veaux. Les taux de fer pour le ratio 1/3 (sur base sobre) sont, pour trois essais différents, inférieurs à 50 pm.

[0105] Quand on compare les compositions C et D, on voit l'intérêt nutritionnel de la composition C. Dans cette composition C, conforme à l'invention, le phosphore et les acides aminés sont en plus grande disponibilité

EXEMPLE 8

[0108] On réalise des essais de production de Péncilline avec différents hydrolysats protèliques comme source d'azote dans les milieux de culture. Cet exemple a pour but de comparer la production de Pénicilline obtenue avec la souche P₇ (Pénicillium chrysogénum) dans un milieu à base d'une composition selon l'invention, à celle obtenue par cette même souche mais dans des milieux modifiés où l'on a remplacé la composition selon l'invention par d'autres hydrolysats de blé, pomme de terre et mais. On travaille à concentration constante en azote total. Les sources d'azote testées ont éte les suivantes.

- 30 com steep,
 - corn steen hydrolysé
 - corn steep
 Alburex^R N
 - Hydrolysat Alburex^R N (Alburex^R hydrolysé).
 - Gluten désamidé (soluble).
 - Composition selon l'invention.
 - Pharmamedia^R.

[0107] Les résultats, exprimés en mm (diamètre de la zone d'inhibition), sont rassemblés dans le tableau ci-après

- 60 corn steep 20
 corn steep hydrolysé 19
 Alburex[®] N 12
 Alburex[®] N 41
 Alburex[®] N 41
 Gluten désamide 20
 61 Composition selon l'invention 26
 Pharmmédia[®] 18
 - [0108] Ces résultats sont représentés sur la figure 1.

[0109] Des sept matières premières testées, c'est avec la composition azotée selon l'invention que l'on obtient la plus grande zone d'inhibition.

Revendications

 Composition azotée résultant de l'hydrolyse du gluten de blé par de l'eau de trempe issue de l'amidonnerie de mais, caractérisée en ce qu'elle présente un rapport des concentrations en phosphore inorganique sur phosphore total (PIIPY) supérieur ou égal à 0,15 et un rapport des concentrations en azote aminé et azote total (Na/Nt) supérieur ou égal à 0,11

- Composition azotée selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente un taux de protéines totales compris entre 50 et 85 % sur sec et un taux de protéines solubles compris entre 40 et 65 % sur sec.
- Composition azotée selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle présente une teneur en alanine libre supérieure ou égale à 1100mg/100g sec et une teneur en leucine libre supérieure ou égale à 1300mg/100g sec
 - Composition azotée selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente une teneur en cendres comprise entre 3 et 12 % sur sec, de préférence comprise entre 4 et 6 % sur sec,
 - Procédé de fabrication d'une composition azotée selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on mélange du gluten de bié avec de l'eau de trempe issue de l'amidonnerie de mais...
- 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives consistant à
 - mélanger de l'eau de trempe issue de l'amidonnerie de mais avec du gluten de blé,
 - laisser agir, sous agitation, les enzymes et l'acide lactique naturellement présents dans le gluten de blé et l'eau de trempe,
- inactiver les enzymes,
- concentrer la composition résultante par évaporation.
- 7. Procédé selon l'une des revendications 5 et 6, caractérisé en ce qu'on métange l'eau de trempe avec le gluten de blé dans une proportion eau de trempe/gluten de blé comprise entre 1/1 et 1/3, sur base sèche.
- 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisé en ce qu'on ajoute, au mélange, une enzyme exogène choisie dans le groupe constitué par les protéases et les phytases seules ou en mélange entre elles.
- Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que le gluten de blé est du gluten vert.
 - 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, caractérisé en ce que la composition est concentrée jusqu'à une matière sèche supérieure ou égale à 50 %.
- 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisé en ce que la composition est atomisée.
 - Utilisation d'une composition azotée selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 comme milieu de culture de microorganismes.
- 13. Utilisation d'une composition azotée selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 en tant qu'aliment ou additif alimentaire dans des compositions destinées aux humains.
 - 14. Utilisation d'une composition azotée selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 en tant qu'aliment ou additif alimentaire dans des compositions destinées aux animaux.

Patentansprüche

10

15

35

45

- Stückstoffhaltige Zusammensetzung, die durch Hydrolyse von Weizengluten mit Hilfe von aus der Meinstarkregewinnung stammendem Queliwasser erhalten wird, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Verhältnis der Konzentrationen von anorganischem Phosphor zu Gesamtphosphor (Pi/Pi) von mehr als oder gleich 0,15 und ein Verhältnis der Konzentrationen von Aminostickstoff und Gesamtstickstoff (Na/Nt) von mehr als oder gleich 0,11 aufweist.
- Stickstoffhaltige Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Gesamtproteingehalt zwischen 50 und 85% trocken und einen Gehalt an löslichen Proteinen zwischen 40 und 65% trocken besitzt.
 - Stickstoffhaltige Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Gehalt an freiem Alanin von mehr als oder gleich 1100mg/100g trocken und einen Gehalt an freiem Leucin von mehr als

oder gleich 1300 mg/100g tracken besitzt.

- Stickstoffhaltige Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Gehalt an Aschen zwischen 3 und 12% trocken, vorzugsweise zwischen 4 und 6% trocken, besitzt.
- Verfahren zur Herstellung einer stickstoffhaltigen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man Weizengluten mit von der Maisstärkegewinnung stammendem Quellwasser mischt.
- 6. Verfahren nach Anspruch 5. dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:
 - das von der Maisstärkegewinnung stammende Quellwasser mit Weizengluten mischen,
 - die Enzyme und die Milchsäure, die im Weizengluten natürlich vorhanden sind, unter Rühren wirken lassen.
 - die Enzyme inaktivieren.

10

20

30

40

50

- die erhaltene Zusammensetzung durch Abdampfen konzentrieren.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, dass man das Quellwasser mit Weizengluten in einem Verhältnis von Quellwasser/Weizengluten zwischen 1/1 und 1/3 auf trockener Basis mischt.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man der Mischung ein exogenes Enzym zusetzt, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus den Protessen und den Phytasen allein oder in Mischung miteinander besteht.
 - 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Weizengluten grünes Gluten ist.
- 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung bis zu einem Trockenmassegehalt von mehr als oder gleich 50% konzentriert wird.
 - Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung sprühgetrocknet wird.
 - Verwendung einer stockstoffhaltigen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als Kulturmedium für Mikroorganismen.
- Verwendung einer stickstoffhaltigen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als Nahrungsmittel
 oder Nahrungsmittelzusatz in für Menschen bestimmten Zusammensetzungen.
 - Verwendung einer stickstoffnaltigen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als Nahrungsmittel oder Nahrungsmittelzusatz in für Tiere bestimmten Zusammensetzungen.

Claims

- Nitrogenous composition resulting from the hydrolysis of wheat gluten by steepwater obtained from the maize starch industry, characterized in that it exhibits a ratio of inorganic phosphorus to total phosphorus (PUP1) concentrations greater than or equal to 0.15 and a ratio of amino nitrogen to total nitrogen (Na/Nt) concentrations greater than or equal to 0.11.
 - Nitrogenous composition according to Claim 1, characterized in that it exhibits a total protein level of between 50 and 85% on a dry basis and a soluble protein level of between 40 and 65% on a dry basis.
 - Nitrogenous composition according to Claim 1 or 2, characterized in that it exhibits a free alanine content greater than or equal to 1100 mg/100 g on a dry basis and a free leucine content greater than or equal to 1300 mg/100 g on a dry basis.
- Nitrogenous composition according to any one of Claims 1 to 3, characterized in that it exhibits an ash content
 of between 3 and 12% on a dry basis, preferably of between 4 and 6% on a dry basis.
 - 5. Process for the manufacture of a nitrogenous composition according to any one of Claims 1 to 4, characterized

in that wheat gluten is mixed with steepwater obtained from the maize starch industry.

- 6. Process according to Claim 5, characterized in that it comprises the successive steps consisting in:
- mixing steepwater obtained from the maize starch industry with wheat gluten.
 - allowing the enzymes and the lactic acid, which are naturally present in the wheat gluten, and the steepwater to act, with stirring.
 - inactivating the enzymes,

10

15

25

35

40

45

55

- concentrating the resulting composition by evaporation.
- concentrating the restricting composition by evaporation.
- Process according to either of Claims 5 and 6, characterized in that the steepwater is mixed with the wheat gluten
 in a steepwater/wheat gluten proportion of between 1/1 and 1/3, on a dry basis.
- Process according to any one of Claims 5 to 7, characterized in that an exogenous enzyme, chosen from the group consisting of proteases and phytases alone or in a mixture with each other, is added to the mixture.
- 9. Process according to any one of Claims 5 to 8, characterized in that the wheat gluten is green gluten.
- Process according to any one of Claims 5 to 9, characterized in that the composition is concentrated to a dry matter greater than or equal to 50%.
- 11. Process according to any one of Claims 5 to 10, characterized in that the composition is spray-dried.
- 12. Use of a nitrogenous composition according to any one of Claims 1 to 4, as microorganism culture medium.
- 13. Use of a nitrogenous composition according to any one of Claims 1 to 4, as food or food additive in compositions intended for humans.
- 14. Use of a nitrogenous composition according to any one of Claims 1 to 4, as food or food additive in compositions intended for animals.

